

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 9 月 1 日 (01.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/079728 A1

(51) 国際特許分類: A61K 6/08, A61C 5/00, 13/08, A61K 6/033, 6/087, 35/32, A61L 27/00, C12N 5/06

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町 MT ビル 19 階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003408

(22) 国際出願日: 2005 年 2 月 23 日 (23.02.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2004-045658 2004 年 2 月 23 日 (23.02.2004) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 植村 壽公 (UEMURA, Toshimasa) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 斎藤 隆史 (SAITO, Takashi) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 藤井 健男 (FUJII, Takeo) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF REGENERATING DENTIN

(54) 発明の名称: 象牙質再生方法

(57) Abstract: It is intended to provide an economical and safe method of regenerating dentin and a material therefor. Namely, a method of regenerating dentin characterized by comprising culturing pulp cells with the use of a complex material containing non-collagenous phosphorylated protein and collagen as a scaffold; and a material for repairing dentin which is prepared by crosslinking a non-collagenous phosphorylated protein with collagen by using divinylsulfone or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide followed by freeze-drying or gelling by heating.

(57) 要約: 本発明は、低廉かつ安全な象牙質再生方法とそのための材料を提供する。すなわち、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む複合材料を足場として歯髄細胞を培養することを特徴とする象牙質の再生方法、および非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを、ジビニルスルホンまたは 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミドを用いて架橋後、凍結乾燥あるいは加熱ゲル化して作製される象牙質修復用材料を提供する。

WO 2005/079728 A1

## 明 細 書

## 象牙質再生方法

## 5 技 術 分 野

本発明は、象牙質の再生方法とそのための複合材料に関する。より詳しくは、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む複合材料と、これを利用した象牙質の再生方法に関する。

## 10 背 景 技 術

近年、歯科領域における象牙質の修復には、人工材料の移植が行われることが多い。こうした人工材料には、生体材料としての生体適合性に加えて、石灰化誘導性—すなわち、移植後、石灰質を誘導しつつ、材料自らは吸収される性質—が求められる。

- 15 象牙質再生用材料としては、セラミックス系材料などが考案されているが、石灰化誘導能の点からは、BMP (bone morphogenic protein) とコラーゲンとの複合材料のほうが有力と考えられており、これ以外に十分な石灰化能が期待できる材料はない。しかし、BMP は強い石灰化能を有するが、水に溶解しにくいこと、最適な担体が見出されていないこと、マウス、ラットなどの小動物では高い石灰化能が認められても、ヒトへの臨床応用では
- 20 0.4 mg/ml 程度の高濃度を必要とすることから、現状では高額医療に利用が限定されると予想される。したがって、BMP に代る、安全かつ安価な、石灰化能を有する生体吸収性材料の開発が望まれている。

- 発明者らは、これまで、歯に含まれるフォスフォフォリンやフォスビチンが単独で骨形成能を有していることを見出しているが (Saito et al. Bone 21 (4) 305-311 (1997))、これらが実際に象牙質再生に応用されたという報告はない。また、発明者らは、フォスフォフォリンをコラーゲンに架橋させた骨再生用複合生体材料について報告しているが (特開 2003-235953 号)、骨再生の結果から象牙質の再生効果を予測することはで
- 25 きない。
- 30

一方、象牙質再生用材料には、生体吸収性であること、歯槽骨や象牙質の歯周病や欠損部位を適切に補填するために、成形が容易でしなやかな力学的特性を有することが望まれる。これに関して、コラーゲンタイプ I は、元来、歯槽骨や象牙質の主な有機成分であり、石灰化の核となることが知られており、スポンジ状、ゲル状と様々な形態のものを作製することができる。しかしながら、コラーゲンタイプ I の石灰化能は極めて低く、単独で象牙質再生を促すことはできない。

#### 発明の開示

10 本発明の課題は、低廉かつ安全な象牙質再生方法とそのための材料を提供することにある。

上記課題を解決するために鋭意検討した結果、本発明者らはフォスフォリン、フォスピチンまたは DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1) 等の非コラーゲン製リン酸化蛋白質に石灰化能が認められることに着目した。そして、これらをコラーゲンに架橋した複合材料を足場として歯髓細胞を象牙芽細胞に分化させれば、優れた象牙質再生が期待できると考えた。

すなわち、本発明は以下の (1) ~ (11) に関する。

(1) 非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む複合材料を足場として歯髓細胞を培養することを特徴とする、象牙質の再生方法。

20 (2) 前記非コラーゲン性リン酸化蛋白質が、フォスフォリン、フォスピチンまたは DMP-1、あるいはそれらの混合物である、上記 (1) 記載の方法。

(3) 前記非コラーゲン性リン酸化蛋白質がコラーゲンに化学架橋されていることを特徴とする、上記 (1) または (2) に記載の方法。

25 (4) 前記複合材料が、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを、ジビニルスルホンまたは 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジアミドを用いて架橋して作製される、スポンジ状あるいはゲル状複合材料である、上記 (1) または (2) に記載の方法。

(5) 増殖因子を添加して培養を行うことを特徴とする、上記 (1) ~ (4) のいずれか 1 に記載の方法

30

- (6) 前記増殖因子が骨形成因子(BMP)である、上記(5)記載の方法。
- (7) 前記コラーゲンがコラーゲンタイプIである、上記(1)～(6)のいずれか1に記載の方法。
- (8) さらに、前記複合材料が、ハイドロキシアパタイト、 $\beta$ -TCP、 $\alpha$ -TCP、ポリグリコール酸、およびポリ乳酸ならびにそれらの誘導体から選ばれる少なくとも1以上を含む、上記(1)～(7)のいずれか1に記載の方法。
- (9) 上記(1)～(8)のいずれか1に記載の方法によって再生された象牙質を前記複合材料とともに含む、象牙質修復用材料。
- (10) 非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを、ジビニルスルホンまたは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミドを用いて架橋後、凍結乾燥あるいは加熱ゲル化して作製される、スポンジ状あるいはゲル状複合材料からなる象牙質修復用材料。
- (11) さらに歯髄細胞を含む、上記(10)記載の象牙質修復用材料。
- 本発明によれば、欠損した象牙質の効果的な再生が可能となる。本発明の象牙質再生方法や象牙質修復用材料は、低廉かつ安全であるため、歯科医療一般における保存的治療手段として有用である。

#### 図面の簡単な説明

- 図1は、ラット覆髄(移植)後1週間目のHE染色像を示す写真である。
- 図2は、ラット覆髄(移植)後2週間目のHE染色像を示す写真である。
- 図3は、ラット覆髄(移植)後3週間目のHE染色像を示す写真である。
- 上記図1～3において、上の2つの染色像はフォスフォリナーコラーゲン複合体移植群(左:x40 右:x100)、下の2つの染色像はコラーゲンスポンジ移植群(左:x40 右:x100)の結果を示す。また、写真中の記号は、D:象牙質、P:歯髄、ND:新生(再生)象牙質を示す。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2004-45658号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む複合材料を足場として歯髄細胞を培養することを特徴とする、象牙質の再生方法に関する。以下、本発明の方法について詳述する。

5 1. 非コラーゲン性リン酸化蛋白質

本発明で使用される「非コラーゲン性リン酸化蛋白質」は、石灰化能を有するコラーゲン以外のリン酸化蛋白質であって、例えば、フォスフォフォリン、フォスピチン、DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1) 等が挙げられる。

10 (1) フォスフォフォリンの調製

フォスフォフォリンは、哺乳類の歯に含まれるリン酸化タンパク質で、単独で骨形成能を有することが知られている (Bone, 1997 Oct;21(4):305-11)。フォスフォフォリンは、市販のもの (和光純薬社製等) を用いてもよいが、例えば以下のようにして得ることができる。哺乳類 (例  
15 えば、ウシやブタ等) の歯を抜歯し、軟組織、歯髄、エナメル質、セメント質を除去する。残った象牙質を細かく粉碎し、これを、蛋白質分解酵素を含む適当な緩衝液 (例えば、0.5M EDTA, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4) を用いて脱灰し、透析した後に凍結乾燥する。次に、得られた凍結乾燥物を緩衝液 (例えば 20mM Tris-HCl, pH 7.4 [蛋白質分解酵素含有]) に溶解し、  
20 塩化カルシウムを添加する。生じた沈殿物を緩衝液 (例えば、0.5M EDTA, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4 [蛋白質分解酵素含有]) に溶解し、透析後、再び凍結乾燥する。最後に、前記凍結乾燥物を尿素溶液 (例えば、4M Urea, 0.01M Tris-HCl, pH 8.0) に溶解後、イオン交換クロマトグラフィー (例えば、DEAE-Sepharose 等) 等により分離する。目的とするフォスフォフォリンは、  
25 リン酸分析およびアミノ酸分析により同定することができる。

(2) フォスピチン

フォスピチンはフォスフォスピチン、ホスピチンあるいはホスホスピチンともいい、脊椎動物卵黄タンパク質の主成分で、卵黄顆粒に含まれるリン酸化蛋白質である。鶏卵フォスピチンは分子量約 10 万、約 10% のリン酸を含  
30 み、アミノ酸の約半分がセリンでそのほとんどがホスホセリン残基になっ

ている。フォスビチンについてもフォスフォフォリン同様、単独で骨形成能を有することが知られている (Bone. 1997 Oct;21(4):305-11)。フォスビチンは、市販のもの (Sigma Chem. Co.) 等) を用いてもよいが、既報 (Shainkin R, Perlmann GE., "Phosvitin, a phosphoglycoprotein. I. Isolation and characterization of a glycopeptide from phosvitin." J Biol Chem. 1971 Apr 10;246(7):2278-84.) に従い容易に調製することができる。

### (3) DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1)

DMP-1 は、歯の象牙質 cDNA ライブラリーから同定された分泌性の非コラーゲン性酸性リン酸化蛋白質で、骨や象牙質などの細胞外マトリックスにおいてその石灰化に関与する (George A. et al., J Biol Chem. 1993 Jun 15;268(17):12624-30.)。DMP-1 遺伝子はヒト染色体では 4q21 に位置し、その近傍に位置するオステオポンチン、MEPE、骨シアロタンパク質遺伝子などとともにファミリーを形成する。DMP-1 は、そのアミノ酸配列から組織中で負に荷電し、カルシウムイオンと結合するため、石灰化に深く関連すると考えられている。実際、DMP-1 の骨芽細胞株への遺伝子導入実験では石灰化の促進が認められること (Feng JQ, et al., J Dent Res. 2003 Oct;82(10):776-80) や、DMP-1 遺伝子の欠損が象牙質形成異常や低石灰化を伴う歯の形成阻害をもたらすこと (Ye L. et al. J Biol Chem. (2004) Feb 13 [Epub ahead of print]) が報告されている。以上のとおり、DMP-1 は骨や歯の石灰化(特に象牙質形成)に重要な分子であると考えられている。

本発明で用いられる DMP-1 は、周知の方法 (George A. et al., J Biol Chem. 1993 Jun 15;268(17):12624-30.) に従い、遺伝子工学的に生産したり、骨や歯の象牙質から抽出、精製することにより調製することができる。

## 2. コラーゲン

本発明で用いられるコラーゲンとしては、骨や歯の有機質の大部分を占め、生体親和性が高いコラーゲンタイプ I が好ましい。前記コラーゲンタイプ I は、市販のものを用いても、公知の方法に従って調製してもよい。例えば、適当な材料 (例えば、ウシやブタの皮膚等の動物の結合組織) から、公知の方法に従ってコラーゲンを抽出・精製する。精製したコラーゲ

ンは凍結乾燥後、酢酸溶液に溶解し、NaCl、NaOH、Hepes 等を添加してインキュベートすることにより、再構成コラーゲンタイプ I 線維として得ることができる。

### 3. 非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンからなる複合材料

- 5 本発明にかかる複合材料は、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む。前記複合材料において、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンの配合比（質量比）は、1：10～1：50 であることが好ましく、1：20～1：40 であることがより好ましい。また、複合材料総量（合計質量）に対し、非コラーゲン性リン酸化蛋白質は 2～10 質量%（以下、単に「質量%」を%と記載する。）配合されることが好ましく、2.5～5.0%配合されることがより好ましい。非コラーゲン性リン酸化蛋白質の量が少なすぎると石灰化能が不十分となり、一方、非コラーゲン性リン酸化蛋白質の量が多すぎると複合材料のコストが高くなるからである。
- 10

- 前記複合材料において、非コラーゲン性リン酸化蛋白質はコラーゲン線維に化学架橋していることが好ましい。架橋剤としては、ジビニルスルホンまたは 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミド等を用いることができる。
- 15

- 例えば、まずコラーゲン線維を炭酸カリウム、炭酸ナトリウム等の炭酸塩水溶液に溶かして室温でインキュベートする。該炭酸塩水溶液の濃度は、好ましくは 0.1M～0.2M、より好ましくは 0.4M～0.5M である。これに、架橋剤、例えば、ジビニルスルホン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミド等を加え、予めコラーゲン繊維上に架橋鎖を導入する。添加する該架橋剤の量は、ジビニルスルホンであれば 5.0 質量%程度が好ましい。
- 20

- 次に、非コラーゲン性リン酸化蛋白質を添加してインキュベートし、コラーゲンと架橋させる。添加する非コラーゲン性リン酸化蛋白質の量は、コラーゲンに対して 1/10～1/50 が好ましく、1/20～1/40 がより好ましい（質量比）。これを、蒸留水、続いて重炭酸塩（例えば、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム等）溶液で洗浄し、余剰の非コラーゲン性リン酸化蛋白質や架橋剤を除去する。最後に、重炭酸ナトリウムとメルカプトエタ
- 25
- 30

ノールを添加して架橋反応を止め、蒸留水でよく洗浄する。

架橋後の複合材料は、そのまま加熱してゲル化させゲル状構造物として用いてもよいし、凍結乾燥してスポンジ状構造物として用いてもよい。このゲル状あるいはスポンジ状の構造は、後述する歯髄細胞培養や歯の欠損部補填に適した特性を与える。

スポンジ状構造物を得る場合、凍結乾燥の条件（例えば、温度、凍結時間、水中での凍結乾燥等）は、所望の複合材料の構造、すなわち比表面積、空隙率、孔（空隙）の大きさ等に応じて、適宜調整することができる。また、得られた凍結乾燥物は、必要に応じて成形し、例えば後述する歯科用インプラント等として利用することができる。なお、「スポンジ状構造」とは、柔軟性を有する微小多孔質構造（数 $\mu\text{m}$ ～数 $10\mu\text{m}$ 程度の無数の孔（空隙）が存在する構造）を意味するものとする。本発明のスポンジ状構造を有する複合材料においては、その空隙率は好ましくは40～90%、より好ましくは60～90%である。この範囲を超えると、細胞の侵入が不十分となり石灰化能が低下するとともに、複合材料自体の強度が低下するからである。

前記スポンジ状構造を有する複合材料は、必須の成分である非コラーゲン性リン酸化蛋白質およびコラーゲンに加えて、本発明の目的・効果を損なわない範囲で、さらにハイドロキシアパタイト、 $\beta\text{TCP}$ 、 $\alpha\text{TCP}$ 、ポリグリコール酸、ポリ乳酸またはその誘導体（例えば、PLLA (poly-l-lactic acid) と PDLA (poly-d-lactic acid) の重合体）等の多孔質の硬材料を含んでいてもよい。

#### 4. 象牙質の再生

本発明の複合材料を足場として歯髄細胞を播種して、適当な条件下で培養すれば、効果的に歯髄細胞を象牙質芽細胞に分化させることができる。歯髄細胞としては、患者自身から単離された歯髄細胞を好適に用いることができる。

細胞の播種は、足場である複合材料に単に播種するだけでもよいし、あるいは、緩衝液、生理食塩水、注射用溶媒、コラーゲン溶液等の液体とともに混合して播種してもよい。また、材料によって、細胞が複合材料の孔にスムーズに入らない場合は、引圧条件下で播種してもよい。播種する細



胞の数（播種密度）は象牙質再生をより効率よく行わせるため、適宜調整することが望ましい。

細胞培養に用いられる培地としては、MEM培地、 $\alpha$ -MEM培地、DMEM培地等、公知の培地を細胞に合わせて適宜選んで用いることができる。

- 5 また、該培地には、FBS（Sigma社製）、Antibiotic-Antimycotic（GIBCO BRL社製）等の抗生物質や抗菌剤、増殖因子、転写因子等を添加しても良い。特に石灰化を促進させる増殖因子である骨形成蛋白質（BMP）を添加することが好ましい。培養は、通常3～10%CO<sub>2</sub>、30～40℃、特に5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で行われるが、これに限定されるものではない。培養期間は、  
10 少なくとも3日以上行うことが望ましいが、これに限定されるものではなく、状況に応じて適宜決定される。

こうして歯髄細胞から分化誘導された象牙質芽細胞は、さらに増殖させ、足場である複合材料とともに、欠損部に埋入あるいは注入することで、歯の象牙質を効果的に再生することができる。

15 5. 象牙質修復用複合材料（歯科用インプラント）

- 本発明により得られる複合材料は、水を吸うとスポンジのような弾性を有し、優れた生体親和性、石灰化能を有する。また、成形が容易で、しなやかな力学的特性を有するため、歯の欠損部のような小さな隙間を適切に充填することができる。すなわち、本発明の複合材料を歯の欠損部に埋入  
20 すると、速やかに周囲組織と結合し、ドナー側組織と複合材料との界面は完全に一体化しうる。したがって、本発明の複合材料は、それ自体、歯の象牙質欠損部を修復・再生させるためのインプラントとして利用できる。

- インプラントとして利用する場合、複合材料は、スポンジ状構造物であっても、ゲル状構造物であってもよい。スポンジの形状やゲルの硬度は補  
25 填すべき欠損部や操作性に合わせて自由に調整できる。さらに、複合材料には他の生理活性物質や薬剤等を含浸させて使用することもできる。例えば、抗炎症剤を含浸させて徐放させれば、歯髄欠損部の術後炎症を効果的に防止することができる。

- 前記象牙質修復用インプラントは、複合材料中に歯髄細胞を播種し、こ  
30 れを *in vitro* で象牙質芽細胞に分化・増殖させてから、足場である複合材

料とともに、欠損部に埋入するものであってもよい。歯髄細胞として、患者由来の細胞を用いれば、それはより理想的な象牙質修復用インプラントとなる。

## 5 実施例

以下、参考例および試験例により本発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

〔参考例〕 フォスフォフォリン/コラーゲン複合材料の製造

### (1) フォスフォフォリンの精製

- 10      まず、ウシ顎骨から永久歯を抜歯し、軟組織、歯髄、エナメル質、セメント質を除去する。残った象牙質を液体窒素下にて 200 メッシュ以下の細粒子に粉碎する。象牙質粉を 0.5M EDTA, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4 [蛋白質分解酵素 : 100mM 6-aminohexanoic acid (和光純薬社製), 5mM benzamidine-HCl, 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride 含有] で 4℃ にて  
15      脱灰する。

- つぎに、EDTA 脱灰液を、4℃ にて脱イオン蒸留水に対し、透析膜 (SPECTRUM MWC0 3500, 132725) を用いて透析して、凍結乾燥 (東京理科機械製 : EYELA FREEZ DRYER 90500042) する。EDTA 抽出物は 20mM Tris-HCl, pH 7.4 (蛋白質分解酵素 含有) に溶解し、最終濃度が 1M になるように  $\text{CaCl}_2$  を添加  
20      する。沈殿物を遠心分離 (日立工機製 : HIMAC CENTRIFUGE345043) により回収し、再び 0.5M EDTA, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4 (蛋白質分解酵素を含有) に溶解し、脱イオン蒸留水に対して透析して、凍結乾燥する。凍結乾燥物を 4M Urea, 0.01M Tris-HCl, pH 8.0 に溶解して DEAE-Sepharose (Sigma Chem. Co. 製) Column Chromatography にて、0-1M NaCl 直線勾配により溶  
25      出させる。

最後に、リン酸分析およびアミノ酸分析によりフォスフォフォリンを同定する。

### (2) コラーゲンタイプ I の精製

- ウシ皮膚を細切し、4℃ にて蒸留水、20% NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4  
30      にて洗浄する。次に、1M NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4 にて overnight

で抽出し、遠心分離により上清を回収し、0.5M 酢酸、1M NaCl を加え overnight で攪拌する。

遠心分離により残渣を回収し、0.5M 酢酸に溶かして、さらに遠心分離を行う。上清を 5M NaOH, 4.4M NaCl で中和し、overnight で攪拌し、遠心分離する。この残渣に 4.4M NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4 を添加し overnight で攪拌し、遠心分離する。

残渣に 2.4M NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4 を添加し overnight で攪拌し、遠心分離する。残渣に 1.7M NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4 を添加し overnight で攪拌し、遠心分離する。得られた上清を 0.1M 酢酸に対して透析し、凍結乾燥する。

凍結乾燥したコラーゲンと 50mM 酢酸を用いて、0.3%コラーゲン酢酸溶液を作成する。0.15M NaCl に続き、0.6N NaOH, 0.1M Hepes（和光純薬社製）を添加して 37℃にてインキュベートすることにより、再構成コラーゲンタイプ I 線維が得られる。

### 15 (3) フォスフォフォリンのコラーゲンへの架橋結合

(2) で得られたコラーゲン線維を 0.5M 炭酸ナトリウムで室温にて overnight でインキュベートする。さらにジビニルスルホン (Sigma Chem. Co. 製) を添加し、2時間インキュベートする。0.5M 炭酸ナトリウムでコラーゲン線維をよく洗浄後、フォスフォフォリンを添加し、overnight でインキュベートして架橋させる。これを蒸留水で洗い、さらに 0.5M 重炭酸ナトリウムでよく洗浄して、過剰なフォスフォフォリンとジビニルスルホンを除去する。

次いで、0.5M 重炭酸ナトリウムとメルカプトエタノールを添加し、overnight でインキュベートして架橋反応を止める。得られた複合体は蒸留水で洗い、さらに 0.5M NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4 および蒸留水で洗浄する。

以上の工程によって得られた複合体を凍結乾燥し、コラーゲン-フォスフォフォリン複合体（スポンジ状シート）を作製した。また、フォスフォフォリンを加えないコラーゲン線維のみを、蒸留水でよく洗った後、凍結乾燥し、フォスフォフォリンを含まないコラーゲン複合体（スポンジ状シ

ート) を作製した。

〔試験例〕 ラットによる象牙質再生試験

1. 試料覆髄

- 5 以下のプロトコールにて、実験的に作製したラット (各々N=3) の歯髄欠損部を参考例 1 で作製したフォスフォオリナーコラーゲン複合体またはコラーゲンスポンジ) で補填し、象牙質再生効果を確認した。
- 1) 硫酸アトロピン 2 ml 筋注
- 2) ホリゾン (ジアゼパム製剤) 4 ml 筋注
- 10 3) ケタラル (塩酸ケタミン) 10 ml 筋注
- 4) 静脈確保のため脚をバリカンにて剃毛
- 5) 翼状針にて静脈路を確保し固定
- 6) ラボナール (チオペンタールナトリウム) 2-3 ml を投与  
(術中は覚醒し始めたら 1-2 ml を投与する)
- 15 7) ポタコール (ピクシリン 250 mg 含有) (電解液) を術中点滴  
もしくは生食水にピクシリン (アンピシリンナトリウム) を投与し点滴
- 8) 2%キシロカイン (塩酸リドカインエピネフリン含有) にて実験歯部位に局所麻酔を施す。
- 9) 窩洞形成
- 20 実験歯  
上顎: 切歯 2, 3 番、犬歯、小白歯 2, 3 番  
下顎: 切歯 3 番、犬歯、小白歯 2, 3 番  
実験歯に、エアータービンダイヤモンドポイントにて直径 2-3 mm 程度の窩洞を形成する。また、生食水注水下で、2 mm のスチールラウンドバーに
- 25 て 1 mm 程度の露髄面を形成する。
- 10) 洗浄および止血。
- 11) 各試料 (フォスフォオリナーコラーゲン複合体、およびコントロールとしてコラーゲンスポンジ) を窩洞面に置く。
- 12) グラスアイオノマーセメントにて仮封。
- 30 13) さらにコンポジットレジンにて修復。

14) 炎症防止のためボルタレン座薬（ジクロフェナクナトリウム）を投与してオペを終了。

## 2. 試料摘出

以下のプロトコールに従い、移植後の試料をラットより摘出した。

- 5 1) 試料覆髄時と同様の方法で静脈確保まで行う。
- 2) 三倍量のラボナール（チオペンタールナトリウム）にて麻酔死させる。
- 3) 実験歯をヘーベル、鉗子にて抜去後直ちに中性ホルマリン溶液にて固定する。

## 3. 評価

- 10 摘出した試料（フォスフォフォリナーコラーゲン複合体及びコラーゲンスポンジ）をヘマトキシリンエオジン染色（HE 染色）し、光学顕微鏡にて組織学的観察を行った。さらに象牙質の形態計測を行うことにより、象牙質再生効果を評価した。

## 4. 結果

- 15 フォスフォフォリナーコラーゲン複合体を移植した場合、コラーゲンスポンジ（コントロール）に比べて極めて早い（2週間）象牙質再生が観察できた。移植3週間後では、旺盛な象牙質再生がフォスフォフォリナーコラーゲン複合体群で観察できた。一方、コラーゲンスポンジでは3週間まで殆ど象牙質の再生は観察できなかった。

20

上記参考例および試験例はフォスフォフォリナーコラーゲン複合体についての実験プロトコールであるが、同様にして、フォスビチナーコラーゲン複合体、DMP-1-コラーゲン複合体を作製し、象牙質再生効果を確認することができる。

25

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

## 産業上の利用の可能性

- 30 本発明の象牙質再生方法や象牙質修復用材料は、低廉かつ安全であるため、

高額医療に限定されない、歯科医療一般における保存的治療手段として利用できる。

## 請 求 の 範 囲

1. 非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む複合材料を足場として歯髄細胞を培養することを特徴とする、象牙質の再生方法。
- 5 2. 前記非コラーゲン性リン酸化蛋白質が、フォスフォフォルイン、フォスピチンまたは DMP-1、あるいはそれらの混合物である、請求項 1 記載の方法。
3. 前記非コラーゲン性リン酸化蛋白質がコラーゲンに化学架橋されていることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の方法。
- 10 4. 前記複合材料が、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを、ジビニルスルホンまたは 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミドを用いて架橋して作製される、スポンジ状あるいはゲル状複合材料である、請求項 1 または 2 記載の方法。
5. 増殖因子を添加して培養を行うことを特徴とする、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 15 6. 前記増殖因子が骨形成因子 (BMP) である、請求項 5 記載の方法。
7. 前記コラーゲンがコラーゲンタイプ I である、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。
8. さらに、前記複合材料が、ハイドロキシアパタイト、 $\beta$ -TCP、 $\alpha$ -TCP、ポリグリコール酸、およびポリ乳酸ならびにそれらの誘導体から選ばれる少なくとも 1 以上を含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 20 9. 請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法によって再生された象牙質を前記複合材料とともに含む、象牙質修復用材料。
- 25 10. 非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを、ジビニルスルホンまたは 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミドを用いて架橋後、凍結乾燥あるいは加熱ゲル化して作製される、スポンジ状あるいはゲル状複合材料からなる象牙質修復用材料。
11. さらに歯髄細胞を含む、請求項 10 記載の象牙質修復用材料。

図 1

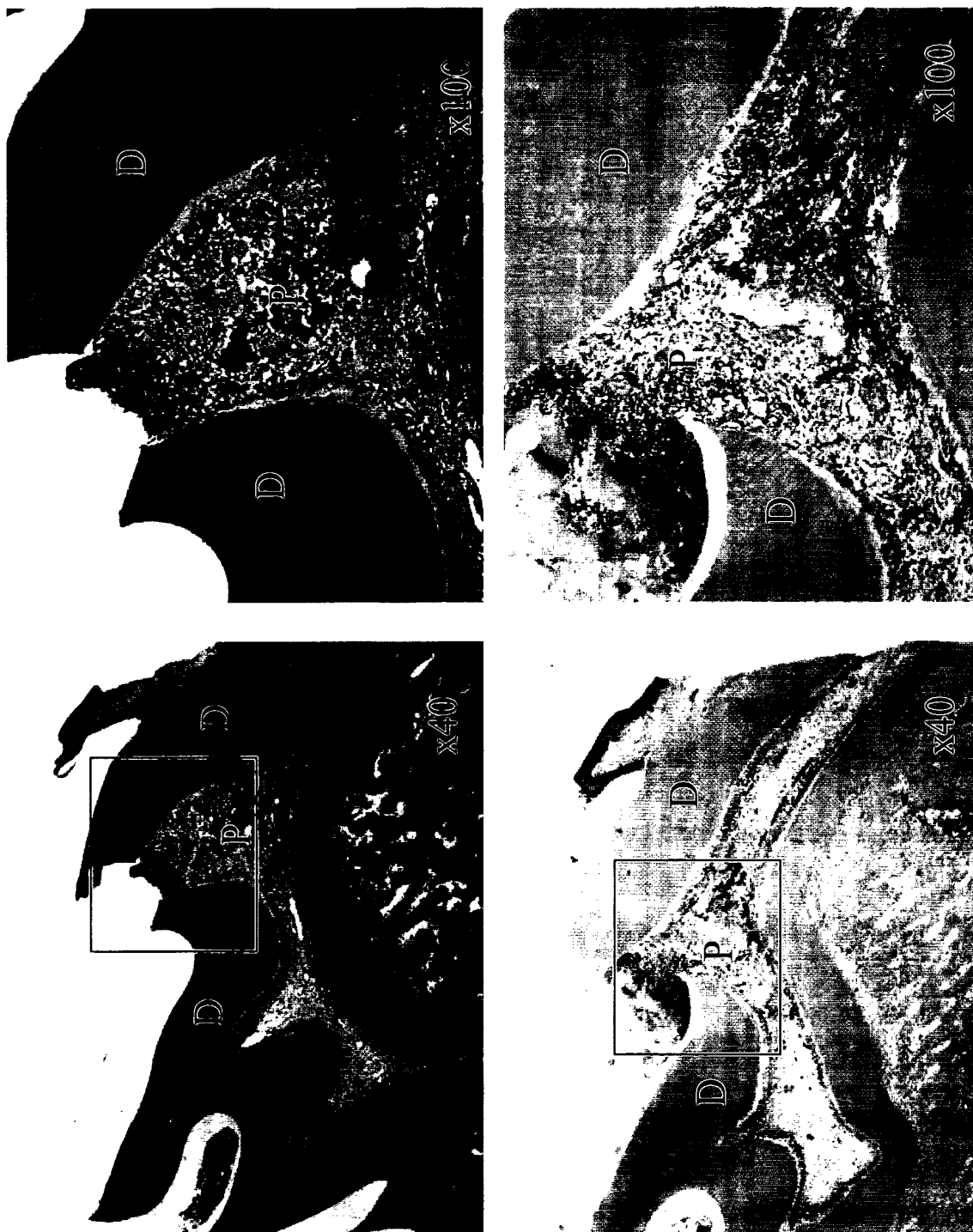
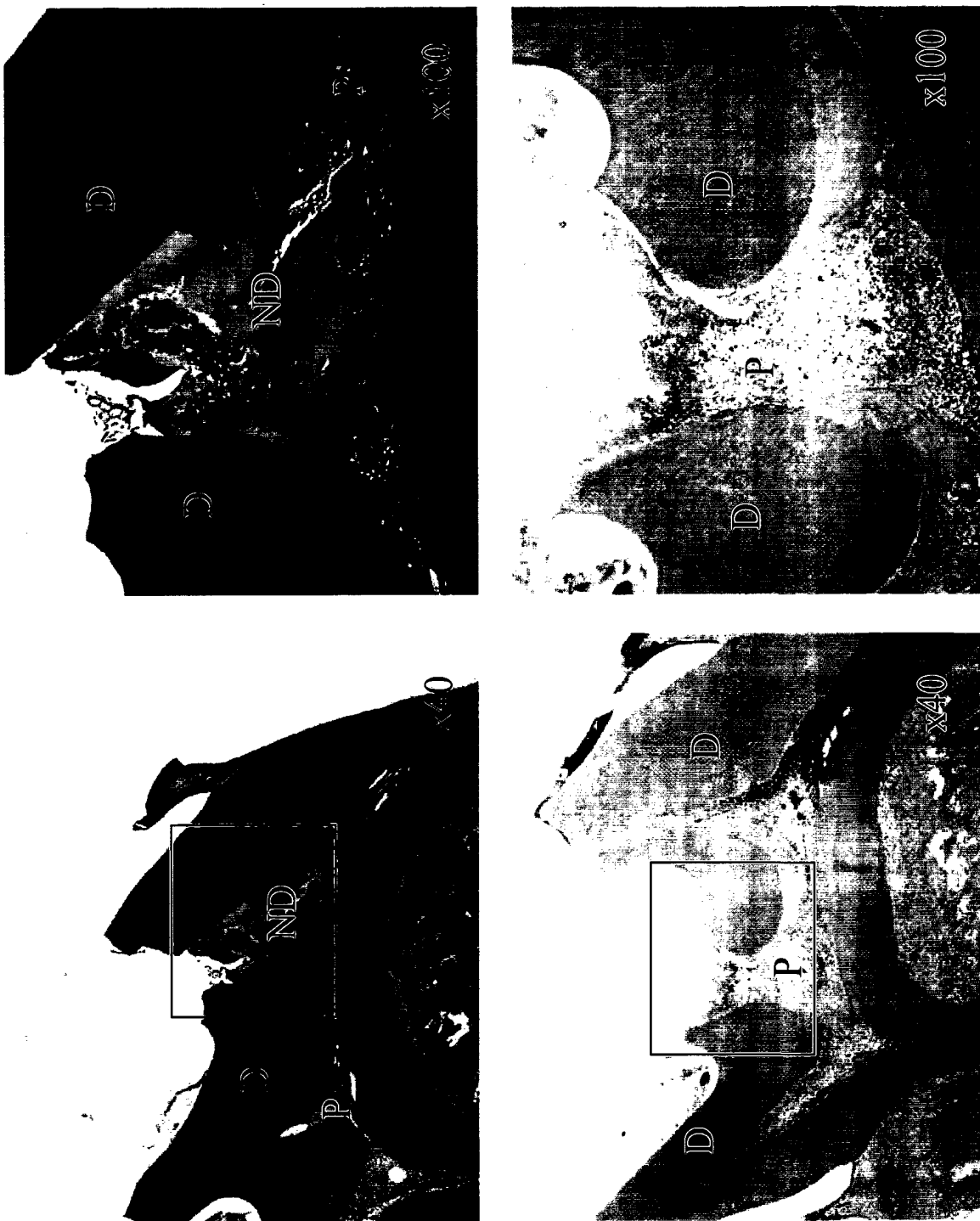




図2



図3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003408

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K6/08, A61C5/00, 13/08, A61K6/033, 6/087, 35/32, A61L27/00, C25N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K6/08, A61C5/00, 13/08, A61K6/033, 6/087, 35/32, A61L27/00, C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), JICST FILE (JOIS), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Takashi SAITO et al., "Zogeshitsu Saiseikkaika to Shizui Saibo kara Zoge Gasaibo heno Bunka", Quittessence, 2003, Vol.22, No.1, pages 216 to 219; Fig. 2	9 10, 11
X Y	Takashi SAITO et al., "Zogeshitsu Kishitsu Model to shitenno Phosphophorin-Sai Kosei Kollagen Sen'I Fukugotai ni yoru Sekkai Yudo", Nihon Shika Hozongaku Zasshi, 1999, Vol.42, No.4, pages 776 to 782, abstract, page 778, right column 2	9 10, 11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
13 April, 2005 (13.04.05)

Date of mailing of the international search report  
26 April, 2005 (26.04.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003408

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Takashi SAITO et al., "Phosphoprotein-Saikosei Kollagen Sen'i Fukugotai ni yoru Sekkaika Yudo Kollagen Sen'i Kozo ga Sekkaika ni Oyobosu Eikyo", Nihon Shika Hozongaku Zasshi, 2000, Vol.43, No.4, pages 826 to 831, abstract, page 828, left column 2	9 10,11
Y	JP 2003-70290 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 26 August, 2003 (26.08.03), & WO 2003/235953 A1 & EP 1477191 A1 & AU 2003208087 A1	9-11
Y	JP 62-224357 A (Regents of the University of Minnesota), 02 October, 1987 (02.10.87), Page 5, left column lower part, lines 1 to 3 & EP 227627 B & US 4698326 A & DE 3675907 G & CA 1279572 C	9-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/003408

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-8  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions as set forth in claims 1 to 8 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K6/08, A61C5/00, 13/08, A61K6/033, 6/087, 35/32, A61L27/00, C12N5/06

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K6/08, A61C5/00, 13/08, A61K6/033, 6/087, 35/32, A61L27/00, C12N5/06

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(STN), CAPLUS(STN), JICST ファイル(JOIS), MEDLINE(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	斉藤隆史 他, 象牙質再石灰化と歯髄細胞から象牙芽細胞への分化, Quintessence, 2003, Vol. 22, No. 1, pp. 216-219, 図 2	9 10, 11
X Y	斉藤隆史 他, 象牙質基質モデルとしてのフォスフォオリナー再 構成コラーゲン線維複合体による石灰誘導, 日本歯科保存学雑誌, 1999, Vol. 42, No. 4, pp. 776-782, abstract, p. 778 右欄 2.	9 10, 11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 04. 2005

国際調査報告の発送日

26.04.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4 C

8415

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	斉藤隆史 他, リンタンパク質-再構成コラーゲン線維複合体による石灰化誘導 コラーゲン線維構造が石灰化に及ぼす影響, 日本歯科保存学雑誌, 2000, Vol. 43, No. 4, pp. 826-831, abstract, p. 828 左欄 2.	9 10, 11
Y	JP 2003-70290 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2003. 08. 26 &WO 2003/235953 A1&EP 1477191 A1&AU 2003208087 A1	9-11
Y	JP 62-224357 A (リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミネソタ) 1987. 10. 02, p. 5 左欄下段第 1 ~ 3 行&EP 227627 B&US 4698326 A&DE 3675907 G&CA 1279572 C	9-11

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲 1-8 の発明は、治療による人体の処置方法に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。